



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

2012/2013

Mariana Pinho Pereira  
Colonização bacteriana em doentes  
com DPOC

março, 2013

FMUP

Mariana Pinho Pereira  
Colonização bacteriana em doentes  
com DPOC

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Pneumologia**

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:  
Doutor José Agostinho Marques Lopes**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:  
Arquivos de Medicina**

março, 2013

FMUP

Eu, Mariana Pinho Pereira, abaixo assinado, nº mecanográfico 070801076, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2013

Assinatura: Mariana Pinho Pereira

**Nome:** Mariana Pinho Pereira

**Email:** mimed07076@med.up.pt

**Título da Monografia:**

Colonização bacteriana em doentes com DPOC

**Orientador:**

José Agostinho Marques Lopes

**Ano de conclusão:** 2013

**Designação da área do projeto:**

Pneumologia

É autorizada a reprodução integral desta Monografia para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projetos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2013

Assinatura: Mariana Pinho Pereira

Título

## **Colonização bacteriana em doentes com DPOC**

Mariana Pereira\*, José Agostinho Marques†

\*Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

†Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

### Correspondência

Mariana Pinho Pereira

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto

Contacto telefónico: (+351) 916 694 575

Correio eletrónico: mimed07076@med.up.pt

### Agradecimentos

Ao Doutor Agostinho Marques, pela disponibilidade e cordialidade com que sempre me recebeu. As suas recomendações e análise crítica foram essenciais para a realização deste trabalho.

### Contagem de Palavras

Resumo: 166

Abstract: 163

Texto Principal: 4596

## **Resumo**

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é a patologia respiratória crónica mais comum no adulto, e embora tratável, é a única doença major que continua a aumentar em prevalência e em mortalidade. O fator de risco mais importante para o seu desenvolvimento é a exposição ao fumo de tabaco, todavia pensa-se que as infeções respiratórias assumam também um papel importante na sua patogénese. O pulmão tem sido um alvo das novas técnicas moleculares para deteção bacteriana, pondo em causa a noção de esterilidade do trato respiratório inferior. No indivíduo saudável, embora as bactérias sejam constantemente inaladas, a infeção não se desenvolve, todavia, na DPOC, a função do sistema imunitário está diminuída. Estudos sugerem que o microbioma respiratório do indivíduo saudável se altere na presença de doenças respiratórias como a DPOC. Para além disso, a presença de bactérias no trato respiratório, mesmo nos doentes com DPOC estável, parece contribuir para um processo inflamatório persistente, levando ao aumento da frequência das exacerbações e declínio acelerado da função pulmonar.

Palavras-chave: doença pulmonar obstrutiva crónica; colonização bacteriana; trato respiratório; inflamação; microbioma

## **Abstract**

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is the most common chronic respiratory disease in adults, and although treatable, it is the only major disease that continues to increase in prevalence and mortality. The most important risk factor for its development is exposure to tobacco smoke, yet it is believed that respiratory infections also take an important role in their pathogenesis. The lung has been a target of new molecular techniques for bacterial detection, undermining the notion of sterility of the lower respiratory tract. In the healthy subject, although bacteria are constantly inhaled, the infection does not develop, however, in COPD, the function of immune system is decreased. Studies suggest that the respiratory microbiome of healthy subjects is affected by the presence of respiratory diseases such as COPD. In addition, the presence of bacteria in the respiratory tract even in patients with stable COPD, seems to contribute to a persistent inflammatory process, leading to increased frequency of exacerbations and an accelerated decline in lung function.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; bacterial colonization; respiratory tract; inflammation; microbiome

## Índice

|  |    |
|--|----|
| Introdução.....  | 5  |
| Métodos.....   | 6  |
| DPOC: definição, causas e fisiopatologia.....                          | 7  |
| Isolamento de bactérias do trato respiratório.....                     | 8  |
| Microbioma respiratório no indivíduo saudável e na DPOC.....           | 10 |
| Efeito do tabagismo na população microbiana do trato respiratório..... | 12 |
| População microbiana no indivíduo saudável e nos doentes com DPOC..... | 13 |
| Infeção bacteriana brônquica na DPOC estável.....                      | 14 |
| Suscetibilidade à infeção bacteriana na DPOC.....                      | 17 |
| Conclusão .....  | 19 |
| Referências .....  | 20 |
| Tabela 1.....  | 25 |



## **Introdução**

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é a patologia respiratória crónica mais comum no adulto, caracterizando-se por uma limitação do fluxo aéreo não totalmente reversível, associada a uma resposta inflamatória pulmonar anormal à inalação de gases ou partículas nocivas. [1] A DPOC é tratável, contudo trata-se da única doença major que continua a aumentar tanto em prevalência como em mortalidade, estimando-se que em 2030 se torne a quarta causa de morte a nível mundial [2].

Embora o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da doença seja a exposição ao fumo de tabaco, pensa-se que as infeções respiratórias assumam também um papel importante na sua patogénese [3]. Apenas 15% dos fumadores desenvolvem DPOC, sugerindo a influência quer de suscetibilidade individual quer de estímulos inflamatórios adicionais [4, 5]. A avaliação de secreções brônquicas de ex-fumadores com DPOC mostra níveis elevados de inflamação do trato respiratório, e embora o declínio da função pulmonar atenua com a cessação tabágica, nestes doentes há persistência de sintomas e recorrência de exacerbações, sugerindo um processo inflamatório persistente no trato respiratório inferior (TRI) de ex-fumadores idêntico ao verificado em fumadores ativos.

Uma possível explicação para este processo inflamatório persistente é a presença de bactérias no trato respiratório dos doentes com DPOC. Por cultura verifica-se, com bastante frequência, a existência de bactérias nas secreções do TRI destes doentes. Esta presença tem sido associada a níveis elevados de inflamação das vias aéreas (avaliada na expectoração), aumento da frequência das exacerbações e um declínio acelerado da função pulmonar [5].

O papel dos microrganismos na patogénese da DPOC tem assim sido largamente estudado, porém ainda há várias questões por responder, devido às dificuldades que se apresentam: limitações na obtenção de amostras respiratórias fiáveis e o não consenso entre autores sobre o papel dos microrganismos no trato respiratório.

## **Métodos**

Foi realizada uma revisão da literatura através da PubMed. As palavras-chave utilizadas foram *COPD*, *stable COPD*, e *bacterial colonization*. Foram incluídos estudos científicos, meta-análises e trabalhos de revisão publicados com *full-text* disponível, limitados ao período entre 2000 e 2012 e escritos em língua portuguesa, inglesa e espanhola.

Para a escolha das referências para este trabalho foi dada prioridade aos estudos mais recentes e provenientes de fontes com grande índice de impacto. Incluíram-se ainda alguns artigos de relevo referenciados nos artigos da primeira pesquisa.

Foi também realizada consulta na sociedade internacional *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD).

## **DPOC: definição, causas e fisiopatologia**

A DPOC é uma doença heterogénea que, para além da componente pulmonar, apresenta também repercussões sistémicas (nomeadamente alterações na função cardíaca e nas trocas gasosas), que afetam o doente de diversas formas e que contribuem para a severidade individual da doença [1].

O diagnóstico de DPOC deve ser suspeitado em todos os doentes que apresentem tosse crónica, produção crónica de expetoração e dispneia em repouso ou de esforço. Porém, a presença destes sintomas não é por si só diagnóstico, mas aumenta a suspeição clínica, sendo recomendado o uso da espirometria para o estabelecimento definitivo do diagnóstico de DPOC [1]. As principais causas para o desenvolvimento da DPOC são o tabagismo, exposição a elevada poluição atmosférica, poeiras e químicos ocupacionais, e ainda causas genéticas, embora raras (a deficiência de alfa 1-antitripsina, proteína que protege o pulmão do dano causado por enzimas, é responsável por 2% dos casos de DPOC) [6].

A exposição ao fumo do tabaco, na DPOC, provoca, nos bronquíolos, infiltração da mucosa, submucosa e do tecido glandular por células inflamatórias, com consequente hiperplasia das células epiteliais e espessamento da parede. Estes fenómenos levam à obliteração progressiva que se acompanha de enfisema. O fumo do tabaco provoca um dano direto nas células epiteliais do trato respiratório, levando à libertação de moléculas intracelulares endógenas, que são reconhecidas por recetores das células epiteliais (os *Toll-like receptors* 4 e 2), ativando uma resposta inflamatória não específica. A interação hospedeiro-agente patogénico é assim um elemento importante.

A limitação do fluxo aéreo observada na DPOC é normalmente progressiva e, em fases avançadas, torna-se incapacitante: a DPOC evolui por exacerbações, isto é, curtos períodos de pelo menos 48 horas caracterizados por dispneia, tosse e produção de expetoração [1]. Estas exacerbações diminuem a qualidade de vida [7], e a sua frequência aumenta com a gravidade da doença, estando associadas a um declínio acelerado da função pulmonar [8] e a complicações como enfisema, bronquite crónica e problemas cardíacos, que no conjunto conduzem a um aumento da morbilidade e mortalidade [4].

Várias são as causas responsáveis pelas exacerbações da DPOC, contudo as infecções bacterianas e/ou víricas são responsáveis por 78% dos casos. Destas exacerbações, 54,7% são de origem bacteriana. Contudo, às infecções bacterianas seguem-se normalmente as infecções víricas, uma vez que as bactérias facilitam a posterior infecção vírica, correspondendo esta coinfeção a 25% das exacerbações, e conduzindo a um agravamento funcional e hospitalizações mais prolongadas [9].

A presença de obstrução do fluxo aéreo é determinada por uma diminuição, após a administração de um broncodilatador, da relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV1) e a capacidade vital forçada (CVF). Um ratio FEV1/CVF (designado índice de *Tiffeneau*) menor que 0,7 é geralmente indicador de obstrução aérea. Contudo, este ratio diminui fisiologicamente com a idade, sendo portanto um valor controverso que leva a excesso de diagnósticos em pessoas idosas [10]. Desta forma, há que ter em conta a exposição a fatores de risco, a presença de sintomas respiratórios ou um FEV1 pós broncodilatador <80% do previsto [1]. Assim, quatro estádios “GOLD” foram definidos:

- estágio GOLD 1: DPOC ligeira, FEV maior ou igual que 80% do previsto,
- estágio GOLD 2: DPOC moderada, FEV1 a 50-80% do previsto,
- estágio GOLD 3: DPOC grave, FEV1 a 30-50% do previsto,
- estágio GOLD 4: DPOC muito grave, FEV menor que 30% do previsto.

### **Isolamento de bactérias do trato respiratório**

Enquanto que a maioria das mucosas do trato respiratório superior (boca, nariz, nasofaringe, orofaringe) de indivíduos saudáveis são colonizadas por bactérias, “classicamente” o trato respiratório inferior (TRI) é considerado estéril [5, 11]. O estudo do microbioma do TRI comparativamente a outros locais onde as colheitas de amostras são mais fáceis de realizar, como por exemplo pele, boca, área genital, apresenta dificuldades acrescidas: obter amostras do TRI não contaminadas pelas secreções do trato respiratório superior (TRS) torna-se difícil, pelo que o número de bactérias neste local é difícil de determinar.

O conhecimento atual no que diz respeito aos microrganismos existentes no TRI baseia-se no estudo qualitativo e quantitativo de cultura de amostras de secreções brônquicas, obtidas de forma espontânea ou induzida; amostras obtidas por broncoscopia (*bronchoscopic protected specimen brush* - PSB), e amostras obtidas por lavagem brônquica (BL) e lavagem broncoalveolar (BAL) [12]. Embora as amostras de secreções brônquicas/expetoração sejam mais fáceis de colher, estas ao passarem pelo TRS são contaminadas pela população microbiana dessa área. A contaminação é atenuada utilizando as técnicas de PSB, BL e BAL, contudo a obrigatória passagem do broncoscópio pelo TRS faz com que a contaminação seja expectável. Para além disso, as técnicas broncoscópicas acarretam riscos e custos e não são úteis quando são necessárias amostragens repetidas, como por exemplo em estudos longitudinais [13]. Hoje verifica-se que as técnicas *standard* de cultura apresentam um grande número de limitações, não permitindo o crescimento de cerca de 70% das espécies bacterianas presentes nas mucosas. Recentes estudos de *polymerase chain reaction* (PCR) realizados para detetar ácidos nucleicos bacterianos têm demonstrado falsos negativos quando comparados com culturas de secreções brônquicas [13].

Novas técnicas moleculares para deteção bacteriana têm vindo então a pôr em causa a noção de esterilidade do TRI [3, 14, 15]. Estas “técnicas não baseadas em cultura” PCR para deteção de ácidos nucleicos microbianos [13, 16], tipagem molecular baseada na técnica de separação por poliacrilamida e eletroforese de campo pulsado (*pulse-field*) para distinguir diferentes estirpes bacterianas [16-18], técnica de hibridização *in situ* e microscopia de imunofluorescência para deteção de microrganismos intracelulares nas amostras de biópsia brônquica [19]. Algumas destas técnicas baseiam-se nas relações evolutivas genómicas entre bactérias e usam semelhanças em genes constitutivos, como o gene altamente conservado 16S rRNA, para conhecer a sua filogenia. Assim, não só rapidamente se identificam espécies bacterianas individualmente, como também se constrói uma imagem da comunidade microbiana completa num sistema - o microbioma -, oferecendo uma análise mais detalhada do que a fornecida pelas técnicas de cultura clássicas. A sensibilidade destas novas técnicas em detetar a presença de microrganismos consegue ser ainda maior. Foi recentemente demonstrado que técnicas de PCR permitem extrair ácidos nucleicos microbianos de amostras de

culturas negativas [13, 16]. Assumindo que estes ácidos nucleicos representam bactérias viáveis, isto mostra que as taxas de colonização serão ainda superiores às sugeridas pela análise de culturas.

O pulmão tem sido um alvo destas técnicas, e vários estudos mostram já que no TRI existem microrganismos, acabando com a noção de esterilidade. A questão que se coloca é se existirá no pulmão e no TRI uma população microbiana que contribua para a não-doença e se esta, quando alterada, leva à doença [11].

### **Microbioma respiratório no indivíduo saudável e na DPOC**

O estudo inicial, por Hilty et al. (2010) [14], ao estudar a presença de 5054 sequências de rRNA bacteriano demonstrou claramente a presença de uma vasta variedade de bactérias no trato respiratório de indivíduos saudáveis não fumadores, estabelecendo a existência de um microbioma respiratório e deitando por terra a noção de esterilidade pulmonar. Os microrganismos mais abundantes pertenciam aos géneros *Prevotella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Corynebacterium* e *Haemophilus* spp. O mesmo estudo sugere que o microbioma respiratório saudável se altere na presença de doenças respiratórias como a DPOC e asma. No grupo de doentes com DPOC verificou-se uma maior prevalência de espécies do filo *Proteobacteria*, particularmente *Haemophilus* spp., do que no grupo de indivíduos saudáveis, no qual os *Bacteroidetes*, sobretudo *Prevotella* spp., são mais comuns. Os membros do género *Haemophilus* estão assim fortemente associados à presença de DPOC [14].

Já em 2012, Pragman et al. [20] publicou um estudo que representa a maior análise (N= 32 indivíduos, 10 controlos e 22 DPOC) de microbioma em DPOC publicada até à data [20]. Os resultados de Pragman indicam uma maior diversidade microbiana em indivíduos com DPOC [20]. Estes resultados contrastam com os obtidos por Erb-Downward et al. num estudo prévio de microbioma de DPOC (2011) [15], que verificou que doentes com DPOC moderada e grave apresentavam pouca diversidade bacteriana.

Erb-Downward et al. [15] chegou a várias conclusões: em primeiro lugar mostrou que os pulmões de indivíduos saudáveis contêm um microbioma bacteriano quantitativamente significativo,

diversificado e diferente do existente na cavidade oral e na nasofaringe (identificou os filo *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* e *Bacteroidetes* - géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas* - como os mais frequentes em pulmões saudáveis); por outro lado, demonstrou que a diversificação bacteriana é geralmente menor em indivíduos com doença mais grave, à custa da dominância da *Pseudomonas* spp.. Previamente à introdução das técnicas independentes de cultura, o *Haemophilus* era considerado o organismo mais frequentemente presente nas amostras de DPOC [21], porém sabe-se agora que está também presente no indivíduo saudável. Tratou-se ainda do primeiro estudo a descrever que diferentes locais microanatómicos do pulmão podem levar a diferenças significativas na estrutura da comunidade bacteriana.

Ora, Pragman [20] constatou que vários indivíduos em cada um dos grupos exibiam contagens de muito baixa diversidade, parecendo certo que uma minoria tanto de doentes com DPOC como de saudáveis exibam baixa diversidade microbiana, podendo distorcer os resultados de estudos que utilizem amostras pequenas, como o caso do de Erb-Downward. Os seus resultados são assim mais concordantes com Sze [22], que mostrou que doentes com DPOC muito grave mantinham maior diversidade microbiana que indivíduos de controlo [16].

Em 2012, Sze et al. [22] identificou mais frequentemente *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* nos pulmões saudáveis. Neste estudo identificaram-se três comunidades bacterianas distintas: uma primeira comum aos grupos fumadores e não-fumadores; uma segunda ligada ao grupo de “GOLD 4”, e uma terceira associada ao grupo controlo. A sequenciação mostrou um aumento do filo *Firmicutes* nos doentes “GOLD 4” VS todos outros grupos ( $p < 0.003$ ), atribuído a um aumento do género *Lactobacillus* ( $p < 0.0007$ ).

Em conclusão, há uma comunidade bacteriana passível de ser detetada no tecido pulmonar humano e que se altera na DPOC muito grave. Para além disso, mais que a severidade da DPOC, também a idade está associada ao aumento da diversidade microbiana [20].

Tanto Erb-Downward como Sze realizaram os seus estudos sobre o microbioma da DPOC em doentes com DPOC muito grave na altura da explantação pulmonar para transplante. Doentes que

esperam transplantação pulmonar comumente experienciam exacerbações de DPOC, necessitando frequentemente de esteróides sistêmicos e/ou antibióticos de largo-espectro. Para além disso, estes doentes terão também uma anatomia pulmonar alterada, devido a doença de longa duração. Essa anatomia anormal e o uso de medicação que pode alterar o microbioma leva a que seja difícil extrapolar estes resultados para doentes com DPOC menos grave. Pragman é o primeiro estudo a descrever o microbioma de um grande grupo de doentes com DPOC cuja doença é relativamente estável, sem esteróides sistêmicos ou uso de antibióticos nos 2 meses prévios. Representam a melhor amostra para estudar as interações entre microbioma, sistema imune e patogénese de DPOC, enquanto a doença evolui.

### **Efeito do tabagismo na população microbiana do trato respiratório**

Sendo o tabagismo um dos maiores fatores associados à DPOC torna-se necessário compreender o efeito do tabaco na presença bacteriana no trato respiratório.

Charlson demonstrou alterações nas comunidades bacterianas no TRS dos fumadores, com perda significativa da diversidade bacteriana, quando comparada com a oro e nasofaringe de não fumadores [11].

Para Erb-Downward [15], os resultados mostram que alguns fumadores apresentam microbiomas menos diversificados que os fumadores saudáveis (isto é, com função pulmonar normal), levando a crer que a alteração do microbioma pulmonar pode ocorrer mesmo sem evidência espirométrica de doença. Estes resultados são consistentes com outros no trato gastrointestinal, onde a diminuição da diversidade microbiana está associada ao aumento da incidência de doença inflamatória intestinal [23]. A alteração bacteriana do pulmão pode fornecer o estímulo inflamatório constante que se observa na DPOC, com a ressalva de que mais estudos devem ser efetuados. Neste estudo concluem que a dominância de um organismo na comunidade microbiana do pulmão está associada a doença. Ao demonstrar que nos pulmões de um sujeito podem existir tanto áreas generalizadas de microbioma “saudável” como locais únicos de comunidades “patogénicas”, estes resultados sugerem um



mecanismo pelo qual a interação entre os agentes patogénicos do pulmão e a imunidade do hospedeiro podem contribuir para a progressão de doença localizada, mesmo na ausência de exacerbação.

Pragman não observou alterações nos resultados baseados na exposição ao tabaco, embora o seu estudo tivesse incluído relativamente poucos indivíduos fumadores ativos na altura da broncoscopia, com uma média de 17,5 unidades maço-ano.

Assim, não parece que o microbioma se altere significativamente como resultado à exposição pelo tabaco. É necessário ter em conta que os efeitos imunomoduladores da exposição a esteróides inibem a resposta imune ao microbioma pulmonar, o que pode permitir a persistência ou expansão do microbioma. Mais estudos longitudinais de microbioma de fumadores tanto antes como após desenvolvimento da DPOC devem ser feitos para responder à questão se exposição ao tabaco altera ou não o microbioma de uma forma que predisponha fumadores ao desenvolvimento da DPOC.

### **População microbiana no indivíduo saudável e nos doentes com DPOC**

Para além das diferentes técnicas de obtenção de amostras, é necessário ter em conta que diferentes autores utilizam diferentes valores de *cut-off* para definição de cultura positiva. Assim, as taxas de culturas positivas variam conforme a técnica utilizada e os valores de *cut-off* definidos (tabela 1). A partir dos vários estudos analisados verificou-se a utilização dos seguintes valores:  $10^2$  ou  $10^5$  unidades formadoras de colónias por mililitro (CFU/mL) para amostras de expetoração ([9, 24-30],  $10^2$  CFU/mL para as obtidas por BL,  $10^2$  ou  $10^3$  CFU/mL para as de PSB e BAL. Após a definição de cultura positiva, as bactérias são divididas em dois grupos: microrganismos potencialmente patogénicos (PPMs) – agentes causadores de infeções respiratórias – e microrganismos não-potencialmente patogénicos (não-PPMs) – agentes normalmente não envolvidos nas infeções respiratórias de imunocompetentes. Como se verifica na tabela 1, estudos que analisam amostras de expetoração obtêm 100% de culturas positivas para qualquer bactéria, sendo 38 a 74% positivas para PPMs. Pela técnica de PSB, a taxa de presença bacteriana é um pouco menor (22-38%), com PPMs presentes em 25-31%, tal como nas técnicas de BL e BAL, positivas em 13-89%, com isolamento de PPMs em 33 a 43% dos casos.

Na maioria dos estudos de colonização do TRI na DPOC, doentes com bronquiectasias são excluídos da análise. Porém, após a introdução da tomografia computadorizada de alta resolução na prática clínica, tornou-se claro que nos doentes com DPOC as bronquiectasias são uma característica comum [31]. Assim, é de esperar então que a taxa de colonização seja ainda mais elevada, o que é suportado pelos dois estudos em que amostras broncoscópicas foram obtidas também de doentes estabilizados com DPOC e bronquiectasias (tabela 1) [32, 33].

### **Infeção bacteriana brônquica na DPOC estável**

Uma possível explicação para a inflamação persistente das mucosas do trato respiratório será a infeção microbiana crónica na DPOC. Essa infeção poderá ser responsável pela alteração da resposta inflamatória do hospedeiro ao fumo de tabaco e servir como estímulo inflamatório adicional, pelo que, ao alterar os mecanismos imunes inatos, os microrganismos consigam persistir no TR na DPOC.

Sabe-se que as bactérias libertam moléculas com efeitos pró-inflamatórios como endotoxinas (lipopolissacarídeo), proteínas de membrana, fragmentos de peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, toxinas e outros [34, 35]. Como resposta, as células epiteliais e os macrófagos produzem mediadores inflamatórios (interleucina [IL]- 6, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral [TNF]- $\alpha$ , proteína quimiotática de monócitos [MCP]-1, proteína inflamatória dos macrófagos [MIP]-1 $\alpha$ ), que por sua vez levam ao recrutamento e ativação de neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias: os neutrófilos são recrutados da circulação sanguínea, via moléculas de adesão como a E-selectina e a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 expressas no endotélio vascular, e ativados em resposta aos quimioatrativos, particularmente a IL-8 e o leucotrieno B4 (LTB4) [35-37]. Assim ativados, os neutrófilos sofrem desgranulação libertando mieloperoxidase (MPO) e elastase, que juntas contribuem para a agressão tecidual [23].

A confirmar esta hipótese, foram demonstrados no TR de doentes de DPOC estável com infeção bacteriana níveis aumentados de marcadores celulares e inflamatórios, nomeadamente neutrófilos, LTB4, MPO, metaloproteinase da matriz (MMP), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, e elastase dos neutrófilos (NE) [5, 25, 26, 38-40]. Também alguns estudos mostraram uma relação

quantitativa entre carga bacteriana e marcadores inflamatórios das secreções brônquicas [25, 28]. Em comparação com doentes não colonizados com um grau semelhante de obstrução do fluxo aéreo, doentes com DPOC colonizados apresentam maior concentração de citocinas inflamatórias, neutrófilos e seus produtos nas secreções respiratórias, o que indicaria um maior nível de inflamação do TR induzida por bactérias [5, 29, 39]. Assim, pode ser estabelecida uma relação entre a presença de bactérias no TR com a inflamação do mesmo. Para além disto, a IL-8 parece ser um mediador chave para este processo. Níveis elevados de MMP-9 e NE correlacionados com contagens de neutrófilos sugerem que estes neutrófilos são a fonte de proteinases destrutivas que contribuem para a progressão da DPOC [5].

A infeção bacteriana está ainda associada a resultados clínicos adversos dos doentes com DPOC, na medida em que provocam aumento da frequência das exacerbações [12, 28], e inflamação sistémica [24, 29]. Todavia, a maior parte dos estudos são estudos transversais, não determinando a direção da associação entre colonização bacteriana e os resultados medidos, ou seja, sabe-se que estão associados mas não de que forma essa associação ocorre. Portanto, a infeção bacteriana pode levar ao aumento da inflamação no TR mas também poderá ser o aumento da inflamação a promover a infeção bacteriana.

Porém, diferentes espécies bacterianas (e até mesmo diferentes estirpes da mesma espécie) diferem na virulência e potencial inflamatório.

Há uma diversidade interespecífica no que diz respeito à duração da colonização. Foi demonstrado que a *Moraxella catarrhalis* é removida de forma mais eficiente do trato respiratório, mesmo sem o uso de antibióticos: na maioria dos indivíduos a *M. catarrhalis* persiste por um único mês, enquanto que *Haemophilus influenzae* coloniza por períodos substancialmente mais longos [34, 41]. Verificou-se ainda que as exacerbações se associavam a períodos de presença bacteriana mais curtos que os da colonização assintomática.

Da mesma forma, a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* parece prolongar-se por mais tempo, particularmente as estirpes que adquirem um fenótipo mucóide. Embora a colonização por *P. aeruginosa* na DPOC não pareça ser inevitável (aliás, como se verifica na tabela 1, não faz parte das 3

bactérias mais comumente presentes), uma vez estabelecidas as estirpes mucóides na DPOC, estas tendem a persistir [16].

Parameswaran et al. [42] também estudou o efeito da aquisição de uma nova estirpe de *M. catarrhalis* nos marcadores inflamatórios das secreções brônquicas. Estas amostras colhidas após a aquisição de *M. catarrhalis* apresentavam níveis superiores de TNF- $\alpha$  e NE, quando comparadas com as amostras pré-aquisição, apoiando a hipótese de que as bactérias induzem inflamação do TR. Contudo, não foram comparados previamente à aquisição os marcadores inflamatórios dos indivíduos que desenvolveram infecção com os que não desenvolveram infecção, pelo que a hipótese de que a inflamação do TR predispõe à infecção bacteriana ainda não esteja esclarecida.

Um estudo realizado por Marin et al. (2010) [26] ao estudar os efeitos da colonização brônquica na inflamação e função pulmonar na DPOC moderada detetou PPMs nas secreções brônquicas de cerca de 75% dos doentes, especialmente *H. influenzae*, *P. aeruginosa* e *Enterobacteria*. Verificou-se que a presença destes PPMs estava fortemente relacionada com uma resposta neutrofílica, ou seja, sugerindo que os efeitos inflamatórios celulares da colonização bacteriana em DPOC moderada dependem sobretudo da presença destes PPMs. Além disso, a colonização por *H. influenzae* foi também associada a concentrações mais elevadas de marcadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$  e IL-12, relação esta que não foi observada para a colonização com *Haemophilus parainfluenzae*, o que sugere que exiba uma baixa adesão à mucosa e que o seu efeito na mesma seja considerado marginal. Assim, estas observações sugerem que a colonização bacteriana é logo capaz de induzir uma resposta inflamatória na mucosa brônquica destes doentes, resposta esta que mostrou ser específica para espécies.

A neutrofilia das secreções brônquicas encontrada na fase estável da doença associa-se a uma significativa diminuição da função pulmonar nestes doentes com DPOC moderada, independentemente dos hábitos tabágicos.

Neste estudo utilizaram ainda técnicas de tipagem molecular para perceber se os PPMs identificados nas duas culturas de secreções brônquicas (com 9 meses de intervalo) correspondiam a aquisições de uma nova estirpe ou se ela persistia a longo prazo. De acordo com esta análise, a

colonização brônquica era mais atribuível a estirpes novas que a estirpes persistentes (menos de 5% das amostras positivas no *follow-up*, e frequentemente correspondiam a colonização por *P. aeruginosa* ou Enterobacteria). Estas observações sugerem que, apesar de uma elevada prevalência de colonização bacteriana em DPOC moderada, a persistência microbiana a longo prazo será menos vezes a sua causa, provavelmente devido a um maior *turnover* de estirpes colonizadores na DPOC menos avançada.

O que esta associação mostra é uma relação inicial entre colonização e o surgimento de mediadores inflamatórios nas secreções brônquicas, anos antes da doença provocar grave diminuição da função respiratória. A importância da resposta inflamatória neutrofílica é enfatizada pela demonstração de uma relação estatisticamente significativa entre o surgimento da resposta inflamatória na primeira consulta e uma diminuição da função pulmonar no *follow-up*. Uma relação semelhante havia sido já documentada por Wilkinson et al. [24], mas não por Hill et al. [25].

Neste estudo, o declínio da FEV1 em doentes com expetoração neutrofílica aproximou-se, em alguns casos, do declínio previamente observada em doentes com DPOC mais grave em exacerbação [9]. Este facto suporta a hipótese de que a colonização brônquica poderá ter um impacto subclínico em DPOC moderada, pois estes doentes estão menos sensibilizados a identificar os seus sintomas diários como uma possível exacerbação [43]. Estes doentes podem apresentar uma diminuição funcional equivalente à associada às exacerbações nas DPOC mais graves.

### **Suscetibilidade à infeção bacteriana na DPOC**

No indivíduo saudável, embora as bactérias sejam constantemente inaladas, a infeção não se desenvolve, graças a um conjunto de defesas do hospedeiro. Todavia, na DPOC, a função das células imunitárias do TR está diminuída, nomeadamente os neutrófilos e macrófagos alveolares. Estas células desempenham um papel-chave na remoção dos microrganismos presentes no TR, através da fagocitose e dando início a respostas imunes. Ora, nos fumadores e na DPOC, devido à indução da resposta inflamatória, o número absoluto de macrófagos e neutrófilos encontra-se aumentado. Assim,

será a sua função a estar diminuída (por exemplo, vários estudos mostram que a fagocitose macrofágica está diminuída na DPOC [40, 43, 44]).

Também se verificam níveis diminuídos de TLR2 em macrófagos [45] e neutrófilos [46] em doentes com DPOC estável e fumadores, comparando com indivíduos saudáveis não-fumadores. O fumo do tabaco reduz a expressão de MARCO (recetor de macrófagos com estrutura de colagénio nos macrófagos), um recetor *scavenger* classe A expresso nos macrófagos que medeia a ligação e adsorção das bactérias Gram + e Gram – [47].

Os péptidos antimicrobianos (AMPS) são moléculas solúveis presentes na superfície do TR, constituindo uma importante primeira linha de defesa contra microrganismos patogénicos como bactérias e vírus. As AMPS incluem proteínas surfactantes, defensinas, elafina, catelicidina e lisozima. Estudos em DPOC das AMPS mostraram diferentes resultados, tanto com aumento [48] como diminuição [49, 50] da beta defensina 2 humana, e aumento de inibidor da proteinase secretada por leucócitos (SLPI) e elafina [50]. Assim, continua por esclarecer se os níveis reduzidos de AMPS contribuem para uma diminuição da resposta imunitária na DPOC.

A antitripsina- $\alpha$ 1 tem como principal função a inibição de protéases, como a elastase de neutrófilos, e a sua deficiência está associada ao desenvolvimento da DPOC. Ora, na deficiência de AAT o excesso de atividade de protease é considerado o mecanismo principal para o desenvolvimento da DPOC. Para além disso, nova evidência mostra que a AAT tem propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antibacterianas [51] e anti víricas [52]. Desta forma, é possível que a deficiência de AAT contribua para a suscetibilidade à infeção na DPOC. Estes doentes com deficiência de AAT apresentam exacerbações frequentes [53], não havendo todavia evidência que as infeções sejam mais frequentes que nos doentes sem deficiência de AAT.

## Conclusão

Parece ser certo que a presença de microrganismos, nomeadamente as bactérias, assumam um papel muito importante na DPOC. Mais que isso, a interação hospedeiro-agente patogénico é um elemento importante no desenvolvimento da DPOC, interferindo com a resolução da doença, a infeção crónica e as exacerbações. A fisiopatologia da doença é grandemente afetada por esta interação, pelo que o desenvolvimento de métodos de diagnósticos e terapias deverá tê-la em conta, possibilitando a utilização de terapias específicas para os agentes patogénicos daquele doente, sobretudo em períodos de exacerbação, previamente identificados por biomarcadores.

Ainda mais estudos deverão ser realizados nesta área, estudos estes que poderão trazer avanços, graças a novos métodos de diagnóstico que permitem identificar diferentes estirpes da mesma bactéria e revelar a sua presença, não detetada pelos métodos clássicos de cultura.

Há muito ainda por investigar nesta área. Devido à infeção crónica da mucosa respiratória (nomeadamente pela *P. aeruginosa*) e à ação pelos agentes microbianos repetidamente administrados a doentes com DPOC, é expectável o desenvolvimento de resistências antimicrobianas. A própria *P. aeruginosa* naturalmente cresce na forma de biofilmes: microecossistemas resistentes aos antibióticos, isto é, as bactérias estão protegidas por uma matriz de exopolissacarídeos, que impede a difusão do antimicrobiano, contribuindo assim para a sua persistência, desenvolvimento de resistências e reinfeções. Assim, as terapêuticas para estes doentes devem basear-se em agentes antimicrobianos eficientes direcionados para os microrganismos envolvidos no processo infeccioso e em terapias eficientes, sobretudo, a curto prazo [54].

## Referências

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD (updated 2013). Disponível em: <http://www.goldcopd.org> (accessed March 05, 2013)
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3(11):e442
3. Beasley V, et al. Lung microbiology and exacerbations in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7(1):555-569
4. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2012;379:1341-1351
5. Sethi S, et al. Airway Inflammation and Bronchial Bacterial Colonization in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(9):991-998
6. Stoller JK, Aboussouan LS.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005;365(9478):2225-2236
7. Spencer S, et al. Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD. *Eur Respir J* 2004;23(5):698-702
8. Donaldson GC, et al. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57(10):847-852
9. Papi A, et al. Infections and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severe Exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(10):1114-1121
10. Vollmer WM, et al. Comparison of spirometry criteria for the diagnosis of COPD: results from the BOLD study. *Eur Respir J* 2009;34(3):588-597
11. Charlson ES, et al. Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(8):957-963
12. Hurst JR, et al. Relationships Among Bacteria, Upper Airway, Lower Airway, and Systemic Inflammation in COPD\*. *Chest* 2005;127(4):1219-1226
13. Matkovic Z, Miravittles M. Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype? *Respir Med* 2013;107(1):10-22



14. Hilty M, et al. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLoS One* 2010;5(1):e8578
15. Erb-Downward J, et al. Analysis of the Lung Microbiome in the “Healthy” Smoker and in COPD. *PLoS One* 2011;6(2):e16384
16. Murphy TF, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(8):853-860
17. Sethi S, et al. New Strains of Bacteria and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2002;347(7):465-471
18. Murphy TF, et al. *Moraxella catarrhalis* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Burden of Disease and Immune Response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(2):195-199
19. Bandi V, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the Lower Respiratory Tract of Patients with Chronic Bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(11):2114-2119
20. Pragman A, Kim H. The Lung Microbiome in Moderate and Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* 2012;7(10):e47305
21. Martinez FD. Role of respiratory infection in onset of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1999;29:53-58
22. Sze MA, et al. The Lung Tissue Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(10):1073-1080
23. Frank DN, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(34):13780-13785
24. Wilkinson TMA, et al. Airway Bacterial Load and FEV1 Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(8):1090-1095
25. Hill AT, et al. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 2000;109(4):288-295
26. Marin A, et al. Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J* 2010;35(2):295-302

27. Miravittles M, et al. Colour of sputum is a marker for bacterial colonisation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2010;11(1):58
28. Patel IS, et al. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002;57(9):759-764
29. Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J* 2004;23(5):685-691
30. Bafadhel M, et al. Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(6):662-671
31. Patel IS, et al. Bronchiectasis, Exacerbation Indices, and Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(4):400-407
32. Weinreich UM, Korsgaard J. Bacterial colonisation of lower airways in health and chronic lung disease. *Clin Respir J*. 2008;2(2):116-22
33. Angrill J, et al. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. *Thorax* 2002;57(1):15-19
34. Murphy TF, et al. Persistent Colonization by *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(3):266-272
35. Berenson CS, et al. Outer Membrane Protein P6 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is a Potent and Selective Inducer of Human Macrophage Proinflammatory Cytokines. *Infect Immun* 2005;73(5):2728-2735
36. Ha U, et al. A Novel Role for I $\kappa$ B Kinase (IKK)  $\alpha$  and IKK $\beta$  in ERK-Dependent Up-Regulation of MUC5AC Mucin Transcription by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2007;178(3):1736-1747
37. White AJ, Gompertz S, Stockley R. Chronic obstructive pulmonary disease • 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2003;58(1):73-80
38. Soler N, et al. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;14(5):1015-1022

39. Seemungal T, et al. Time Course and Recovery of Exacerbations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(5):1608-1613
40. Taylor AE, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* 2010;35(5):1039-1047
41. Hiltke TJ, Sethi S, Murphy TF. Sequence Stability of the Gene Encoding Outer Membrane Protein P2 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the Human Respiratory Tract. *J Infect Dis* 2002;185(5):627-631
42. Parameswaran G, et al. *Moraxella catarrhalis* acquisition, airway inflammation and protease-antiprotease balance in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Infect Dis* 2009;9(1):178
43. Martí-Llitas P, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* Clearance by Alveolar Macrophages Is Impaired by Exposure to Cigarette Smoke. *Infect Immun* 2009;77(10):4232-4242
44. Berenson CS, et al. Impaired Phagocytosis of Nontypeable *Haemophilus influenzae* by Human Alveolar Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Infect Dis* 2006;194(10):1375-1384
45. Droemann D, et al. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005;6:68
46. von Scheele I, et al. Toll-like receptor expression in smokers with and without COPD. *Respir Med* 2011;105(8):1222-1230
47. Baqir M, et al. Cigarette smoke decreases MARCO expression in macrophages: Implication in *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respir Med* 2008;102(11):1604-1610
48. Andresen E, et al. Increased Expression of Beta-Defensin 1 (DEFB1) in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* 2011;6(7):e21898
49. Pace E, et al. Beta Defensin-2 Is Reduced in Central but Not in Distal Airways of Smoker COPD Patients. *PLoS One* 2012;7(3):e33601
50. Tsoumakidou, M, et al. Innate immunity proteins in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 2010;36(6):373-380

51. Griesse M, et al.  $\alpha$ 1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2007;29(2):240-250
52. Zhou X, et al. HIV Replication in CD4+ T Lymphocytes in the Presence and Absence of Follicular Dendritic Cells: Inhibition of Replication Mediated by  $\alpha$ -1-Antitrypsin through Altered I $\kappa$ B $\alpha$  Ubiquitination. *J Immunol* 2011;186(5):3148-3155
53. Vijayasaratha K, Stockley RA. Relationship between frequency, length, and treatment outcome of exacerbations to baseline lung function and lung density in alpha-1 antitrypsin-deficient COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7:789-796
54. Canton R, et al. Chronic bronchial infection: the problem of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Bronconeumol* 2011;6:8-13
55. Rosell A, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2005;165(8):891-897
56. Monsó E, et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(4):1316-1320

Tabela 1 – Percentagens de culturas positivas, culturas positivas para PPMs e agentes patogénicos mais frequentemente isolados utilizando amostras obtidas por expetoração, PSB e BAL e BL, em indivíduos saudáveis, doentes com DPOC e bronquiectasias.

| Autor                       | Técnica;<br>N amostras;<br><i>Cut-off</i><br>(CFU/mL) | Indivíduos, N   | Cultura<br>positiva<br>para<br>bactérias,<br>N (%) | Cultura<br>positiva para<br>PPM,<br>N (%) | Cultura<br>positiva<br>para<br>não-PPM,<br>N (%) | PPM mais<br>frequentemente<br>isolado                    |
|-----------------------------|---|---|--|---|--|--|
| Papi [9]<br>2006            | Expet;<br>64;<br>$\geq 10^6$                          | DPOC estável (10<br>semanas pós-exac.), 64                          | -  | 24 (37.5%)                                |  | <i>Hi, Sp, Mc, Sa</i>                                    |
| Wilkinson [24]<br>2003      | Expet;<br>30;<br>$\geq 10^5$                          | DPOC estável, 30  | 30 (100%)  | Inicialmente:<br>16 (53%)<br>Após 1 ano:  | -  | <i>Hi, Mc, Hp</i>  |
| Hill [25]<br>2000           | Expet;<br>336;<br>$\geq 10^5$                         | DPOC estável, 117<br>Bronquiectasias, 43                            | -  | 247 (74%)                                 |  | <i>Hi, Hp, Mc, Pa</i>                                    |
| Marin [26]<br>2010          | Expet;<br>79;<br>$\geq 10^2$                          | DPOC estável, 40  |  | 58 (73.4%)                                |  | <i>Hi, Pa, Hp, Ent</i>                                   |
| Miravittles<br>[27]<br>2010 | Expet;<br>119;<br>$\geq 10^2$                         | DPOC estável, 119   |  | 58 (48.7%)                                |  | <i>Hi, Hp, Pa</i>  |
| Patel [28]<br>2002          | Expet;<br>29;<br><i>cut-off</i> nf                    | DPOC estável, 29  | 67 (100%)  | 15 (51.7%)                                |  | <i>Hi, Sp</i>  |
| Rosell [55]<br>2005         | PSB;<br>337;<br>$\geq 10^2$                           | Saudáveis, 70<br>DPOC estável, 181<br>DPOC exac, 86                 | -<br>-<br>-  | 3 (4%)<br>53 (29%)<br>46 (54%)            | -<br>-<br>-                                      | <i>Hi</i><br><i>Hi, Sp</i><br><i>Hi, Pa, Sp</i>          |
| Monsó [56]<br>1995          | PSB;<br>69;<br>$\geq 10^3$                            | DPOC estável, 40<br>DPOC exac, 29                                   | -  | 10 (25%)<br>15 (52%)                      | -  | <i>Hi, Sp</i><br><i>Hi, Sp, Pa, Mc</i>                   |
| Soler [38]<br>1999          | PSB;<br>40;<br>$\geq 10^2$                            | DPOC exac, 40   | 27 (68%)   | 18 (45%)                                  | 10 (25%)   | <i>Hi, Sp, Mc, Pa</i>                                    |
| Angrill [33]<br>2002        | PSB;<br>75;<br>$\geq 10^2$                            | Bronquiectasia estável, 75<br>(49% com DPOC)                        | -  | 46 (61%)                                  | 22 (29%)   | <i>Hi, Pa, Sp, Mc</i>                                    |
| Sethi [5]<br>2006           | BAL;<br>61;<br>$\geq 10^2$                            | Saudáveis (n-fum), 15<br>Saudáveis (ex-fum), 20<br>DPOC estável, 26 | -<br>-<br>-  | 1 (6.7%)<br>0 (0%)<br>9 (34.6%)           | 6 (40%)<br>4 (20%)<br>6 (23%)                    | <i>Hp</i><br>-<br><i>Hi, Hp</i>                          |
| Soler [38]<br>1999          | BAL;<br>64;<br>$\geq 10^3$                            | Saudáveis, 12 (100%fum)<br>DPOC estável, 52                         | -  | 5 (42%)<br>17 (33%)                       | 7 (58%)<br>28 (54%)                              | <i>Sp, Sa, Hi, Mc</i><br><i>Sp, Sa, Hi, Mc</i>           |
| Weinrich [32]<br>2008       | BL;<br>143;<br>$\geq 10^2$                            | Saudáveis, 48<br>DPOC estável, 53<br>Bronquiectasia estável, 32     | 43 (90%)<br>47 (89%)<br>31 (97%)                   | 5 (10%)<br>23 (43%)<br>20 (63%)           | -  | <i>Hi, Sp</i><br><i>Hi, Sp</i><br><i>Hi, Sp, Ent, Pa</i> |
| Angrill [33]<br>2002        | BAL;<br>59;<br>$\geq 10^3$                            | Bronquiectasia estável, 59<br>(49% com DPOC)                        | -  | 33 (56%)                                  | 19 (32%)   | <i>Hi, Pa, Sp</i>  |

Expet.: expetoração; PSB: broncoscopia; BAL: lavagem broncoalveolar; BL: lavagem brônquica; CFU: unidades formadoras de colónias; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crónica; exac.: exacerbação; fum.: fumadores; n-fum.: não fumadores; ex-fum.: ex-fumadores; *Hi*: *Haemophilus influenzae*; *Sp*: *Streptococcus pneumoniae*; *Mc*: *Moraxella catarrhalis*; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Hp*: *Haemophilus parainfluenzae*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Ent*: *Enterobactérias*

## **ANEXO I**

### **Instruções aos Autores**

# Instruções aos Autores

Estas instruções seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam investigação original nas diferentes áreas da medicina, favorecendo investigação de qualidade, particularmente a que descreva a realidade nacional.**

Os manuscritos são avaliados inicialmente por membros do corpo editorial e a publicação daqueles que forem considerados adequados fica dependente do parecer técnico de pelo menos dois revisores externos. A revisão é feita anonimamente, podendo os revisores propor, por escrito, alterações de conteúdo ou de forma ao(s) autor(es), condicionando a publicação do artigo à sua efectivação.

Todos os artigos solicitados serão submetidos a avaliação externa e seguirão o mesmo processo editorial dos artigos de investigação original.

Apesar dos editores e dos revisores desenvolverem os esforços necessários para assegurar a qualidade técnica e científica dos manuscritos publicados, a responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

Todos os artigos publicados passam a ser propriedade dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Uma vez aceites, os manuscritos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento dos ARQUIVOS DE MEDICINA.

Apenas serão avaliados manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas. Quando existem publicações semelhantes à que é submetida ou quando existirem dúvidas relativamente ao cumprimento dos critérios acima mencionados estas devem ser anexadas ao manuscrito em submissão.

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

De acordo com uma avaliação efectuada sobre o material apresentado à revista os editores dos ARQUIVOS DE MEDICINA prevêem publicar aproximadamente 30% dos manuscritos submetidos, sendo que cerca de 25% serão provavelmente rejeitados pelos editores no primeiro mês após a recepção sem avaliação externa.

## TIPOLOGIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS NOS ARQUIVOS DE MEDICINA

### Artigos de investigação original

Resultados de investigação original, qualitativa ou quantitativa.

O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total) e até 15 referências.

Todos os artigos de investigação original devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

### Publicações breves

Resultados preliminares ou achados novos podem ser objecto de publicações breves.

O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

### Artigos de revisão

Artigos de revisão sobre temas das diferentes áreas da medicina e dirigidos aos profissionais de saúde, particularmente com impacto na sua prática.

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões quantitativas (Meta-análise).

O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões quantitativas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

As revisões devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada, devendo ser estruturados no caso das revisões quantitativas.

### Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição acerca de tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica.

O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

Os comentários não devem apresentar resumos.

### Casos clínicos

Os ARQUIVOS DE MEDICINA transcrevem casos publicamente apresentados trimestralmente pelos médicos do Hospital de S. João numa selecção acordada com o corpo editorial da revista. No entanto é bem vinda a descrição de casos clínicos verdadeiramente exemplares, profundamente estudados e discutidos. O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

### Séries de casos

Descrições de séries de casos, tanto numa perspectiva de tratamento estatístico como de reflexão sobre uma experiência particular de diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As séries de casos devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

### Cartas ao editor

Comentários sucintos a artigos publicados nos ARQUIVOS DE MEDICINA ou relatando de forma muito objectiva os resultados de observação clínica ou investigação original que não justifiquem um tratamento mais elaborado.

O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

### Revisões de livros ou software

Revisões críticas de livros, software ou sítios da internet.

O texto deve ser limitado a 600 palavras, sem tabelas nem figuras, com um máximo de 3 referências, incluindo a do objecto da revisão.

As revisões de livros ou software não devem apresentar resumos.

## FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A formatação dos artigos submetidos para publicação nos ARQUIVOS DE MEDICINA deve seguir os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 11 pontos, e justificado à esquerda.

Aconselha-se a utilização das letras Times, Times New Roman, Courier, Helvetica, Arial, e Symbol para caracteres especiais.

Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título.

Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito.

Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção.

Não devem ser inseridos cabeçalhos nem rodapés.

Deve ser evitada a utilização não técnica de termos estatísticos como aleatório, normal, significativo, correlação e amostra.

Apenas será efectuada a reprodução de citações, tabelas ou ilustrações de fontes sujeitas a direitos de autor com citação completa da fonte e com autorizações do detentor dos direitos de autor.

### Unidades de medida

Devem ser utilizadas as unidades de medida do Sistema Internacional (SI), mas os editores podem solicitar a apresentação de outras unidades não pertencentes ao SI.

### Abreviaturas

Devem ser evitados acrónimos e abreviaturas, especialmente no título e nos resumos. Quando for necessária a sua utilização devem ser definidos na primeira vez que são mencionados no texto e também nos resumos e em cada tabela e figura, excepto no caso das unidades de medida.

### Nomes de medicamentos

Deve ser utilizada a Designação Comum Internacional (DCI) de fármacos em vez de nomes comerciais de medicamentos. Quando forem utilizadas marcas registadas na investigação, pode ser mencionado o nome do medicamento e o nome do laboratório entre parêntesis.

### Página do título

Na primeira página do manuscrito deve constar:

- 1) o título (conciso e descritivo);
- 2) um título abreviado (com um máximo de 40 caracteres, incluindo espaços);
- 3) os nomes dos autores, incluindo o primeiro nome (não incluir graus académicos ou títulos honoríficos);
- 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado;
- 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e e-mail;
- 6) os agradecimentos, incluindo fontes de financiamento, bolsas de estudo e colaboradores que não cumpram critérios para autoria;
- 7) contagens de palavras separadamente para cada um dos resumos e para o texto principal (não incluindo referências, tabelas ou figuras).

### Autoria

Como referido nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", a autoria requer uma contribuição substancial para:

- 1) concepção e desenho do estudo, ou obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados;
- 2) redacção do manuscrito ou revisão crítica do seu conteúdo intelectual;
- 3) aprovação final da versão submetida para publicação.

A obtenção de financiamento, a recolha de dados ou a supervisão geral do grupo de trabalho, por si só, não justificam autoria.

É necessário especificar na carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho. Esta informação será publicada.

Exemplo: José Silva concebeu o estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. António Silva colaborou na concepção do estudo e efectuou a análise dos dados. Manuel Silva efectuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito.

Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

É necessária a aprovação de todos os autores, por escrito, de quaisquer modificações da autoria do artigo após a sua submissão.

### Agradecimentos

Devem ser mencionados na secção de agradecimentos os colaboradores que contribuíram substancialmente para o trabalho mas que não cumpram os critérios para autoria, especificando o seu contributo, bem como as fontes de financiamento, incluindo bolsas de estudo.

### Resumos

Os resumos de artigos de investigação original, publicações breves, revisões quantitativas e séries de casos devem ser estruturados (introdução, métodos, resultados e conclusões) e apresentar conteúdo semelhante ao do manuscrito.

Os resumos de manuscritos não estruturados (revisões não quantitativas e casos clínicos) também não devem ser estruturados.

Nos resumos não devem ser utilizadas referências e as abreviaturas devem ser limitadas ao mínimo.

### Palavras-chave

Devem ser indicadas até seis palavras-chave, em português e em inglês, nas páginas dos resumos, preferencialmente em concordância com o Medical Subject Headings (MeSH) utilizado no Index Medicus. Nos manuscritos que não apresentam resumos as palavras-chave devem ser apresentadas no final do manuscrito.

### Introdução

Deve mencionar os objectivos do trabalho e a justificação para a sua realização.

Nesta secção apenas devem ser efectuadas as referências indispensáveis para justificar os objectivos do estudo.

### Métodos

Nesta secção devem descrever-se:

- 1) a amostra em estudo;
- 2) a localização do estudo no tempo e no espaço;
- 3) os métodos de recolha de dados;
- 4) análise dos dados.

As considerações éticas devem ser efectuadas no final desta secção.

### Análise dos dados

Os métodos estatísticos devem ser descritos com o detalhe suficiente para que possa ser possível reproduzir os resultados apresentados.

Sempre que possível deve ser quantificada a imprecisão das estimativas apresentadas, designadamente através da apresentação de intervalos de confiança. Deve evitar-se uma utilização excessiva de testes de hipóteses, com o uso de valores de p, que não fornecem informação quantitativa importante.

Deve ser mencionado o software utilizado na análise dos dados.

### Considerações éticas e consentimento informado

Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial ([www.wma.net](http://www.wma.net)).

Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável.

### Resultados

Os resultados devem ser apresentados, no texto, tabelas e figuras, seguindo uma sequência lógica.

Não deve ser fornecida informação em duplicado no texto e nas tabelas ou figuras, bastando descrever as principais observações referidas nas tabelas ou figuras.

Independentemente da limitação do número de figuras propostos para cada tipo de artigo, só devem ser apresentados gráficos quando da sua utilização resultarem claros benefícios para a compreensão dos resultados.

### Apresentação de dados numéricos

A precisão numérica utilizada na apresentação dos resultados não deve ser superior à permitida pelos instrumentos de avaliação.

Para variáveis quantitativas as medidas apresentadas não deverão ter mais do que uma casa decimal do que os dados brutos.

As proporções devem ser apresentadas com apenas uma casa decimal e no caso de amostras pequenas não devem ser apresentadas casas decimais.

Os valores de estatísticas teste, como t ou  $\chi^2$ , e os coeficientes de correlação devem ser apresentados com um máximo de duas casas decimais.

Os valores de p devem ser apresentados com um ou dois algarismos significativos e nunca na forma de p=NS, p<0,05 ou p>0,05, na medida em que a informação contida no valor de P pode ser importante. Nos casos em



que o valor de  $p$  é muito pequeno (inferior a 0,0001), pode apresentar-se como  $p < 0,0001$ .

### Tabelas e figuras

As tabelas devem surgir após as referências. As figuras devem surgir após as tabelas.

Devem ser mencionadas no texto todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras) de acordo com a ordem em que são discutidas no texto.

Cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto do manuscrito.

Para as notas explicativas das tabelas ou figuras devem ser utilizados os seguintes símbolos, nesta mesma sequência:

\*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡.

Cada tabela ou figura deve ser apresentada em páginas separadas, juntamente com o título e as notas explicativas.

Nas tabelas devem ser utilizadas apenas linhas horizontais.

As figuras, incluindo gráficos, mapas, ilustrações, fotografias ou outros materiais devem ser criadas em computador ou produzidas profissionalmente.

As figuras devem incluir legendas.

Os símbolos, setas ou letras devem contrastar com o fundo de fotografias ou ilustrações.

A dimensão das figuras é habitualmente reduzida à largura de uma coluna, pelo que as figuras e o texto que as acompanha devem ser facilmente legíveis após redução.

Na primeira submissão do manuscrito não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raios-X. As figuras, criadas em computador ou convertidas em formato electrónico após digitalização devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito.

Uma vez que a impressão final será a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos não deverão ter cores. Gráficos a três dimensões apenas serão aceites em situações excepcionais.

A resolução de imagens a preto e branco deve ser de pelo menos 1200 dpi e a de imagens com tons de cinzento ou a cores deve ser de pelo menos 300 dpi.

As legendas, símbolos, setas ou letras devem ser inseridas no ficheiro da imagem das fotografias ou ilustrações.

Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores.

Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

### Discussão

Na discussão não deve ser repetida detalhadamente a informação fornecida na secção dos resultados, mas devem ser discutidas as limitações do estudo, a relação dos resultados obtidos com o observado noutras investigações e devem ser evidenciados os aspectos inovadores do estudo e as conclusões que deles resultam.

É importante que as conclusões estejam de acordo com os objectivos do estudo, mas devem ser evitadas afirmações e conclusões que não sejam completamente apoiadas pelos resultados da investigação em causa.

### Referências

As referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. Os números das referências devem ser apresentados entre parentesis. Não deve ser utilizado software para numeração automática das referências.

Pode ser encontrada nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referências, de que se acrescentam alguns exemplos:

#### 1. Artigo

• Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreaticobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

#### 2. Artigo com Organização como Autor

• The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 64:282-4.

#### 3. Artigo publicado em Volume com Suplemento

• Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

#### 4. Artigo publicado em Número com Suplemento

payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

#### 5. Livro

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

#### 6. Livro (Editor(s) como Autor(es))

Norman IJ, Redfern SJ, editores. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone;1996.

#### 7. Livro (Organização como Autor e Editor)

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute;1992.

#### 8. Capítulo de Livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press;1995. p. 465-78.

#### 9. Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Devem ser utilizados os nomes abreviados das publicações, de acordo com o adoptado pelo Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Deve ser evitada a citação de resumos e comunicações pessoais.

Os autores devem verificar se todas as referências estão de acordo com os documentos originais.

### Anexos

Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de dados, poderá ser solicitado aos autores para que seja fornecido a pedido dos interessados.

### Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

### Autorizações

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- consentimento informado de cada participante;
- consentimento informado de cada indivíduo presente em fotografias, mesmo quando forem efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- transferência de direitos de autor de imagens ou ilustrações;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;
- autorizações dos colaboradores mencionados na secção de agradecimentos.

### SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Os manuscritos submetidos aos ARQUIVOS DE MEDICINA devem ser preparados de acordo com as recomendações acima indicadas e devem ser acompanhados de uma carta de apresentação.

**Carta de apresentação**

Deve incluir a seguinte informação:

- 1) Título completo do manuscrito;
- 2) Nomes dos autores com especificação do contributo de cada um para o manuscrito;
- 3) Justificação de um número elevado de autores, quando aplicável;
- 4) Tipo de artigo, de acordo com a classificação dos ARQUIVOS DE MEDICINA;
- 5) Fontes de financiamento, incluindo bolsas;
- 6) Revelação de conflitos de interesse ou declaração da sua ausência;
- 7) Declaração de que o manuscrito não foi ainda publicado, na íntegra ou em parte, e que nenhuma versão do manuscrito está a ser avaliada por outra revista;
- 8) Declaração de que todos os autores aprovaram a versão do manuscrito que está a ser submetida;
- 9) Assinatura de todos os autores.

É dada preferência à submissão dos manuscritos por e-mail (submit@arquivosdemedicina.org).

O manuscrito e a carta de apresentação devem, neste caso, ser enviados em ficheiros separados em formato word. Deve ser enviada por fax (225074374) uma cópia da carta de apresentação assinada por todos os autores.

Se não for possível efectuar a submissão por e-mail esta pode ser efectuada por correio para o seguinte endereço:

ARQUIVOS DE MEDICINA  
Faculdade de Medicina do Porto  
Alameda Prof. Hernâni Monteiro  
4200 – 319 Porto, Portugal

Os manuscritos devem, então, ser submetidos em triplicado (1 original impresso apenas numa das páginas e 2 cópias com impressão frente e verso), acompanhados da carta de apresentação.

Os manuscritos rejeitados ou o material que os acompanha não serão devolvidos, excepto quando expressamente solicitado no momento da submissão.

**CORRECÇÃO DOS MANUSCRITOS**

A aceitação dos manuscritos relativamente aos quais forem solicitadas alterações fica condicionada à sua realização.

A versão corrigida do manuscrito deve ser enviada com as alterações sublinhadas para facilitar a sua verificação e deve ser acompanhada duma carta respondendo a cada um dos comentários efectuados.

Os manuscritos só poderão ser considerados aceites após confirmação das alterações solicitadas.

**MANUSCRITOS ACEITES**

Uma vez comunicada a aceitação dos manuscritos, deve ser enviada a sua versão final em ficheiro de Word®, formatada de acordo com as instruções acima indicadas.

No momento da aceitação os autores serão informados acerca do formato em que devem ser enviadas as figuras.

A revisão das provas deve ser efectuada e aprovada por todos os autores dentro de três dias úteis. Nesta fase apenas se aceitam modificações que decorram da correcção de gralhas.

Deve ser enviada uma declaração de transferência de direitos de autor para os ARQUIVOS DE MEDICINA, assinada por todos os autores, juntamente com as provas corrigidas.

## **Apêndices**

### Agradecimentos

Ao Doutor Agostinho Marques, pela orientação científica, recomendações e análise crítica, e pela disponibilidade e cordialidade com que sempre me recebeu;

À Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Pacheco, pelo apoio, esclarecimentos prestados e disponibilidade para a leitura do artigo, com revisão crítica do mesmo;

À Dr.<sup>a</sup> Ana Penas e ao Dr. Nuno Ferreira, pela disponibilidade, leitura e crítica do artigo e sugestões.